



Title	Harvesting epithelial keratinocyte sheets from temperature responsive dishes preserves basement membrane proteins and improves cell survival in skin defect model
Author(s)	長田, 篤祥
Journal	2016
URL	http://hdl.handle.net/10470/31576

主論文の要約

Harvesting epithelial keratinocyte sheets from temperature responsive dishes preserves basement membrane proteins and improves cell survival in skin defect model

温度応答性培養皿より回収した表皮細胞シートは基底膜蛋白が温存され、ラット皮膚欠損モデルへの移植において生着率が向上する

東京女子医科大学大学院
先端生命医科学系専攻 代用臓器学分野
(指導: 清水 達也教授)

長田 篤祥

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine
in press

【目的】

1975 年 Green らにより表皮細胞の培養方法が確立されて以降、1980 年代より培養表皮移植が臨床応用されてきた。培養表皮移植における問題として、回収時の酵素処理が生着率の低下の原因のひとつではないかと考えられている。本学では温度応答性培養皿を用いることで、低温処理のみで細胞シートの回収を可能としてきた。表皮細胞の回収において、低温処理での回収方法は酵素処理を行わないため、生着に重要とされる基底膜構成因子が温存され、生着に優位に作用するのではないかと考えた。そこで酵素処理と低温処理による表皮細胞シート基底膜蛋白についての比較、および移植実験を行い、その発現量、移植後の生着率について評価を行った。

【対象および方法】

SD 新生仔ラット背部皮膚より単離した表皮細胞を温度応答性皿と通常の細胞培養皿でそれぞれ培養し、シートを作成した。回収したシートを基底膜構成蛋白であるコラーゲンタイプ 4 および 7、ラミニン 5 について蛍光免疫染色を行い、さらに透過型電子顕微鏡 (TEM) でシートの観察を行った。また GFP 陽性 SD 新生仔ラットより作成したそれぞれの表皮細胞シートをヌードラット背部

皮膚全層欠損モデルに移植し、移植後 7 日目に生着の有無を確認した。また組織切片、TEM にて評価を行った。

【結 果】

温度応答性皿から低温処理にて回収した表皮細胞シートと通常の細胞培養皿から酵素処理で回収した表皮細胞シートはいずれもシート状に回収が可能であった。TEM においてそれぞれ基底膜様構造が構築されていることが確認された。免疫染色では温度応答性皿群でラミニン 5、コラーゲン 4 が酵素処理群に比べ、発現量が多く、温存されていることが確認された。移植実験においては温度応答性皿群で有意に生着率が高かった。また組織切片の免疫染色においてはラミニン 5、コラーゲン 4 は正常皮膚と同様の発現を認めた。TEM では基底膜構造が部分的に構築されている様子が観察された。

【考 察】

コラーゲン 4、ラミニン 5 は基底膜構造のなかで基底板の主要構成成分として知られている。温度応答性培養皿を用いて回収した細胞シートではコラーゲン 4、ラミニン 5 が温存されたが、酵素処理で回収したシートでは時間依存性にそれらが減少することが確認された。表皮細胞シートの短期的な生着率とこれら基底膜蛋白が関連していることが考えられる。今回の実験では長期生着に重要と考えられるコラーゲン 7 の発現が認められず、今後はより長期的な観察が必要と考えられる。

【結 論】

表皮細胞移植において基底膜蛋白を保持した状態での移植が生着率を有意に向上することが確認された。温度応答性培養皿を使用することで表皮細胞シート移植における臨床治療成績の向上が期待される。